

令和3年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「小規模事業者における HACCP の検証に資する研究」

分担研究報告書

高度耐熱性芽胞を形成したあるウェルシュ菌の加熱後の温度管理と菌の挙動

研究分担者 五十君 静信（東京農業大学）  
研究協力者 渡會 烈、横田 健治、梶川 揚申、檜木 真吾（東京農業大学）  
高柳 晃司、川宮 美由紀、山森 慶子、曲尾 優花  
（ホシザキ北信越株式会社 コンサル室）  
金盛 幹昌（ホシザキ株式会社 営業本部）  
高澤 秀行、矢野 俊博、多賀 夏代、高澤 慎太郎  
戸田 政一（株式会社高澤品質管理研究所）

#### 研究要旨

公益社団法人日本食品衛生協会発行の「HACCP の考え方を取り入れた衛生管理のための手引書」（小規模な一般飲食店業者向け）グループ3「加熱後冷却し再加熱するもの、または加熱後冷却するもの：カレー。スープ。ソース。たれ、ポテトサラダ等」の追加実験としてクリームシチュー調理におけるウェルシュ菌増殖危険温度帯の滞留時間とウェルシュ菌増殖の相関性の再現性検証と制御法について検討した。

ウェルシュ菌に関するこれまでの研究成果として、形態的に芽胞となっても必ずしも100℃耐熱性を獲得するとは限らないこと。食中毒由来株でも、検討した菌株では100℃耐熱性の芽胞となることはむしろまれであり、ある条件がそろわないと100℃耐熱性を獲得しないこと。そのような高度耐熱性芽胞がどのようなメカニズムで形成されるかはまだ不明であるが、昨年までの研究により、100℃耐熱性を持つ高度耐熱性芽胞を形成させる条件を確立した。この高度耐熱性芽胞を用いてシチュー調理における、ウェルシュ菌の加熱後の温度管理と菌の挙動を明らかにした。高度耐熱性獲得株は、危険温度帯55℃～25℃では、急速に増殖し、3時間以内に発症菌数に到達してしまうため、中心部の温度を2時間以内に危険温度帯を通過させる必要がある。一般的に行われている深鍋の外部から流水による冷却では深鍋中心部の温度変化から本菌の増殖制御は難しいことを示した。本年度はまず本菌の制御に温度管理方法のみでどの程度管理できるかについて再現性を検証した。また温度管理のみの制御は容易ではないと思われることから、本菌が偏性嫌気性菌である性質を利用し、酸素分圧等の制御がその増殖制御に活用可能であるかについて検討した。

#### A. 研究目的

公益社団法人日本食品衛生協会発行の「HACCP の考え方を取り入れた衛生管理のための手引書」（小規模な一般飲食店業者向け）グループ3「加熱後冷却し再加熱するもの、または加熱後冷却するもの：カレー。スープ。ソース。たれ、ポテトサラダ等」の調理におけるウ

ェルシュ菌増殖危険温度帯の滞留時間とウェルシュ菌増殖の相関性を、模擬素材としてシチューを用いて検討した。

本年度は昨年実施した危険温度帯における実験結果の再現性を確認するとともに、危険温度帯を通過させた後の温度管理についての検討を行った。調理後、直ちに10℃以下に保存す

ることによるウェルシュ菌の増殖抑制の効果の確認も行った。また危険温度帯通過後、調理食品を室温に放置した場合の菌数の変化についても検証した。

ウェルシュ菌が偏性嫌気性菌であることから、酸素分圧等を利用した制御方法についても検討した。

## B. 研究方法

メーカー所定の調理方法で調製したクリームシチューを 80℃まで冷却し、これに 85℃、10 分処理で高度耐熱性を確認したウェルシュ菌芽胞液をスパイクし、空気が混ざらないように静かに攪拌し菌を分散させた。

①加熱後 10℃急速冷却で危険温度帯通過後シチューを室温 (25℃) 放置した場合

②加熱後、徐々に冷却して危険温度帯を 2 時間程度かけて通過後シチューを室温 (25℃) 放置した場合

を想定し、冷却後の室温 (25℃) 放置でのウェルシュ菌の菌数の挙動を明らかにし、昨年度得られた伊藤ら結果の再現性を確認した。

(1) 耐熱性芽胞菌の調製 (別紙 1)

① *Clostridium perfringens* (ウェルシュ菌) H6174 を変法 DS 培地にて増菌培養 (35℃・48 時間) した菌株 (保存液①) を 65℃10 分でヒートショック処理を行った。

② ブレインハートインフュージョン培地 (BHI 培地) に 0.1m 塗抹、35℃・48 時間培養後の発育を観察した。

③ BHI 培地上で発育が確認された保存液①を、1/10 量を DS 培地に添加して 35℃・48 時間培養し (保存液②)、70℃10 分のヒートショック処理を行い BHI 培地にて発育を確認した。

④ 上記の操作を 75℃・80℃・85℃まで行い、耐熱性の強いウェルシュ菌芽胞懸濁液を作成した。

\*) 各ヒートショック処理後の BHI 培地上で発育が確認されない場合は同温で再度ヒートショック処理を行い、BHI 培地上で発育が確認できるまで培養を繰り返した。

(2) ウェルシュ菌芽胞懸濁液をスパイクした

## クリームシチューの調製

ウェルシュ菌を接種したクリームシチューを中試験管に 15ml ずつ小分けにし、これに嫌気状態を確保するため、流動パラフィン 1ml 加えて空気を遮断し以下①②の操作を行った。

① 危険温度帯滞留時間が長時間の場合 (恒温槽で温度コントロール)

上記検体を 80℃の恒温槽に漬け、平成 29 年度の厚労科研費研究報告書で示した深鍋を流水を用いて冷却した場合のカレーの中心部の温度変化データ (グラフ 1) に合わせて恒温槽の温度をコントロールしながら各温度帯 (0 時間、1 時間、3 時間～10 時間、24 時間) 全 12 点での菌数を算定し発芽する温度帯と時間を記録した。

② 危険温度帯滞留時間が短時間の場合 (冷蔵庫保存)

上記検体を直ちに 10℃以下の冷蔵庫に保存し、0 時間、1 時間、3 時間、6 時間、24 時間の菌数を測定した。

材料:

①クリームシチュールー、合挽肉、じゃがいも、人参

②変法 Duncan and Strong 培地 (食品検査指針微生物編 2018 年 参照)

③ ハンドフォード培地 (Mast Group Lot405525)

④ブレインハートインフュージョン培地 (OXOID Lot2359557)

⑤嫌気パウチ

⑥自動記録温度ロガー

⑦ディスポメスピペット 20ml 用他ピペットル類

⑧鍋 (2L)

⑨恒温槽

⑩試験管立

⑪冷蔵庫 (10℃以下)

菌株: *Clostridium perfringens* Nagano 10

\*以後 ウェルシュ菌と記す

(3-1) 危険温度帯滞留時間が長時間に及ぶ場合 (恒温槽放置)

① クリームシチューを 80℃に保ちながら

中試験管に約 15ml 分注（温度確認用としてウェルシュ菌無添加のクリームシチュー3本）して各試験管に流動パラフィン1ml 重層し、恒温槽に漬けて 80℃から室温までの温度変化をコントロールした

② 平成 29 年度分担研究報告書の温度変化表（寸胴鍋中カレーの中心温度変化：グラフ1）に合わせ、恒温槽の温度を 30 分単位でコントロールして 0 時間・1 時間～10 時間・24 時間（0 時間～10 時間までは 1 時間毎）に試験管を各 3 本抜き取り時間帯により増殖予測に対応して階段希釈した検体をハンドフオード培地パウチ培養法、37℃で培養した。

・ 0 時間～2 時間まで：

1 乗～4 乗 cfu/ml 希釈で培養

・ 3 時間～4 時間まで：

1 乗～5 乗 cfu/ml 希釈で培養

・ 5 時可～7 時間まで：

2 乗～7 乗 cfu/ml 希釈で培養

・ 8 時間～9 時間まで：

2 乗～8 乗 cfu/ml 希釈で培養

・ 10 時間まで：

5 乗～8 乗 cfu/ml 希釈で培養

・ 24 時間まで：

5 乗～9 乗 cfu/ml 希釈で培養

（3-2）危険温度帯滞留時間が短時間の場合（冷蔵庫放置）（別紙2）

冷蔵庫（10℃以下）に放置して 0、1、3、6、24 時間までの菌の増殖を観察した。

再現性などを確認するために同様な実験を、東京農大でも行い菌数の動向について検証した。こちらでは、主に危険温度帯（55℃～30℃）におけるウェルシュ菌の菌数動向を調べると共に、冷却により危険温度帯を 2 時間以内に通過させた後、室温放置した場合の菌数動向を明らかにした。

（4）酸素分圧の変化に伴う菌数挙動の観察

GAM ブイヨン培地を調製し太口試験管に 45ml ずつ分注後オートクレーブ滅菌（121℃、15 分）により培地内の酸素を追い出した。オートクレーブ滅菌後、各試験管に酸素分圧が異なるよう

培地に対し 0 回～10 回のかき混ぜを行い、気中・液中蛍光パッチ酸素計（エイブル株式会社レンタル）を用いて培地内の酸素量を測定した。測定後、酸素量が変わらないよう流動パラフィン 1ml を重層した。流動パラフィンを重層後一晩静置培養（4℃）を行い、時間経過による新たな酸素の溶け込みを評価するため再度培地内の酸素量の測定を行った。測定後調製を行った芽胞液（終濃度  $10^4$  CFU/ml）1ml を添加し、空気が入らないようゆっくりと混和した。

芽胞液添加後ウォーターバスを用いて 25℃で保温し一晩静置培養を行う。培養後菌液を抜き取り 0.85%生理食塩水にて段階希釈を行う。希釈後は希釈した菌液 10ml とクロストリジア測定用培地 15ml を嫌気性パウチにシーラーを用いて封入し、一晩静置培養（37℃）を行った。培養後、黒色のコロニーのカウントにより生菌数（CFU/ml）の算出を行った。

### C. 研究結果

① 加熱調理後、冷蔵庫放置で 30 分後 10℃とした後 25℃における菌数変化実験（別紙 3-1.3-2）

0 時間（25℃）から 3 時間までは  $4.2 \times 10^4 \sim 6.5 \times 10^4$  cfu/g の範囲で安定しているが 4 時間後から徐々に菌数が増加していき 9 時間後から  $\times 10^6$  オーダーとなり発症菌数まで到達した。

② 加熱調理後徐々に冷却した場合の 2 時間後 25℃における菌数変化実験（別紙 4）（別紙 5-1.5-2）（別紙 6）

「予備試験温度グラフ」の温度変化に従って冷却開始 2 時間で 25℃とした。2 時間（25℃から培養開始）から 3 時間後までは  $1.3 \times 10^4 \sim 3.1 \times 10^4$  cfu/g の範囲で安定しているが 4 時間後から菌数が増加していき 5 時間後から  $\times 10^6$  オーダーとなり発症菌数まで到達した。

（4）酸素分圧の変化に伴う菌数挙動の観察

0～10 回のかき混ぜにより、酸素分圧が 0.84mg/L から 1.69mg/L まで顕著に増加する結果が得られた。（Fig.1）また一晩静置後の再測定において一度目の測定値よりも全体的に

0.20～0.40mg/L 高い酸素分圧を示す結果が得られた。

さらに生菌数測定の結果いずれの培養液においても  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL 程度まで増殖し発症菌数を上回る結果となった。(Fig. 2) なお、かき混ぜ回数が3回と4回の培養液に関しては菌数測定を省略したため、データを示していない。

#### D. 考察

令和2年度東京農業大学の伊藤らにより「予備試験温度グラフ」の温度変化に従ってシチューを急速冷却後、室温(25℃)放置することで室温放置3時間後には発生菌数まで増殖するとの報告がなされた。

我々は令和2年度検証実験報告で加熱調理後のシチューにおいて室温まで1時間以内に危険温度帯を通過させる急速冷却により菌の増速を回避できるとしたが伊藤らの報告により、急速冷却後そのまま室温放置3時間後には発症菌数に到達してしまい、完全にウェルシュ菌の増殖を抑制することは難しいことが示された。

今般、我々は伊藤らの実験結果を確認することを目的として検証実験を行った。

実験は加熱調理後、

①冷蔵庫30分放置で10℃まで急冷しその後25℃とした：危険温度帯30分以内に通過した場合を想定(初発0時間目)

②「予備試験温度グラフ」の温度変化に従って徐々に冷却し2時間で25℃とした：危険温度帯2時間以内で通過した場合を想定(初発2時間目)

① ②の方法で比較を行った(別紙6)

①の場合は6時間までは $\times 10^4$  cfu/g オーダーで推移しており急速な増殖は見られないが、9時間後から $\times 10^6$  cfu/g オーダーとなり食中毒発症菌数に増殖することが確認された。

②の場合は25℃(初発)から3時間までは $\times 10^4$  cfu/g で推移しており急速な増殖は見られないが4時間後は $7.3 \times 10^5$  cfu/g、5時間後から $\times 10^6$  cfu/g オーダーとなり食中毒発症菌数に増殖することが確認された。

本結果により伊藤らでは室温3時間後、我々は5時間後と若干の時間差はあるものの冷却後室温放置での増殖の再現性は確認された。

しかしながら冷蔵庫30分放置で10℃まで急冷しその後25℃とした場合では発症菌数増殖までに9時間を要した。

本結果により伊藤らの場合、危険温度帯での放置時間が1時間程度あり、その期間の誘導期が長くなり、その後の25℃保存で3時間～5時間で増殖したものと推察された。

一方、冷蔵庫30分放置で10℃まで急冷しその後25℃とした場合は危険温度帯を短時間で通過させて25℃としているので誘導期が短くなり9時間後に増殖したものと推察された。

以上により一般飲食店業者ではシチュー・カレー等の粘性のある深鍋調理品は食中毒予防のため以下のことを実施することが求められる。

- ① 加熱調理後危険温度帯を早く通過させるため1時間以内に10℃以下に冷却する。
- ② 顧客へ提供するまでの間は3時間以上の室温放置はしない。

#### (4) 酸素分圧の変化に伴う菌数挙動の観察

酸素分圧による制御を検討したが、今回再現した酸素分圧ではウェルシュ菌の生育制御に至らないことが分かった。ウェルシュ菌は偏性嫌気性菌の中でも比較的低い嫌気度で増殖することが知られている。(1) 今回実験を行った範囲の酸素分圧ではウェルシュ菌の増殖制御に影響しないことに加え、その酸素分圧の範囲が具体的な数値として得られた。そのため今後の展望として今回得られた酸素分圧の値より高い酸素分圧を再現しウェルシュ菌の制御に有効な具体的な数値を追求する必要があると考える。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

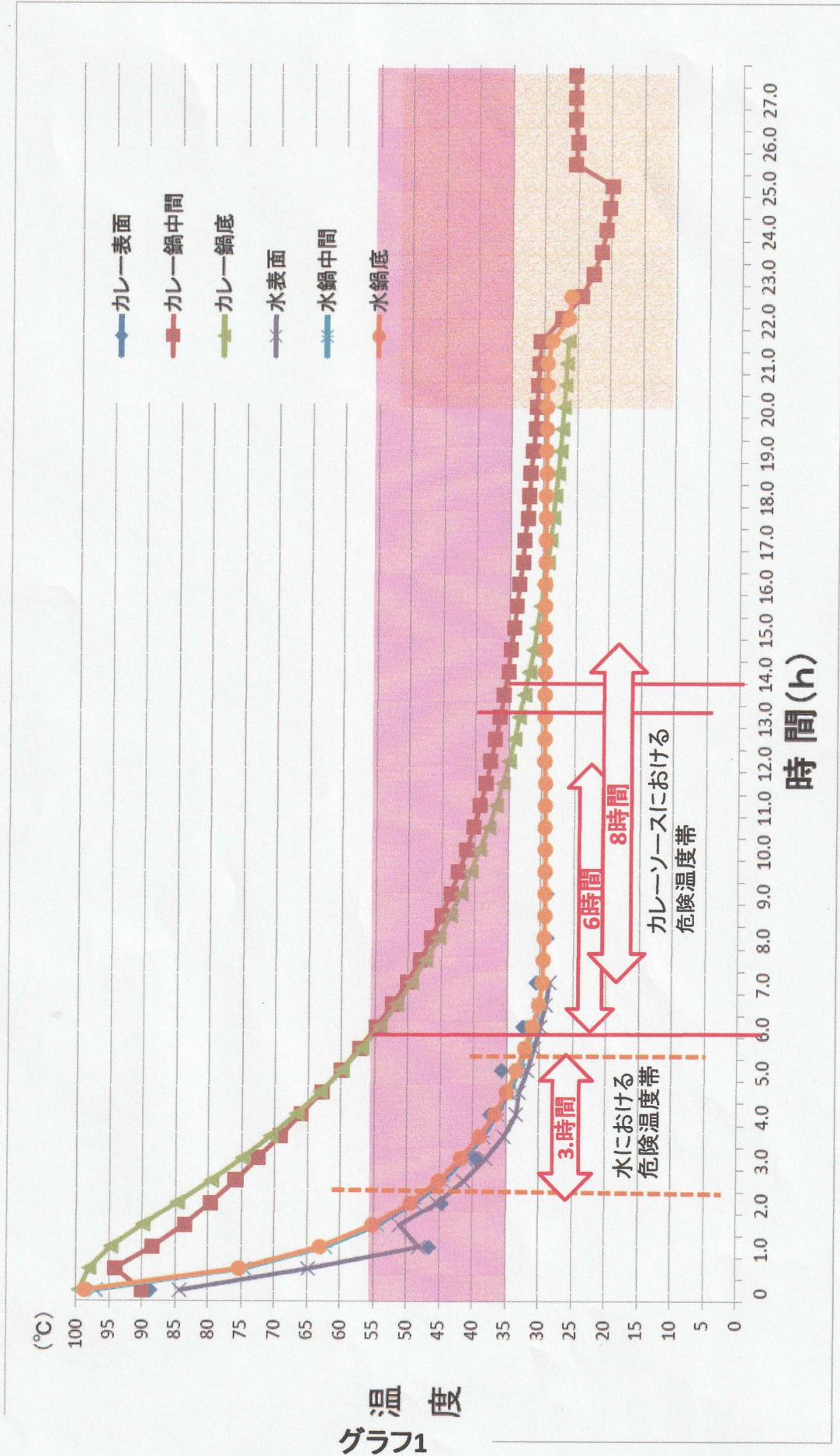
1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
  - 1) 五十君静信。日本機能水学会。  
2021. 10. 31。長井記念ホール対面及びweb録画。基調講演：HACCP制度化後の食品衛生管理における公的検査と自主検査、その意義と役割

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得           なし
2. 実用新案登録       なし

2)                   。

# 予備試験温度変化グラフ



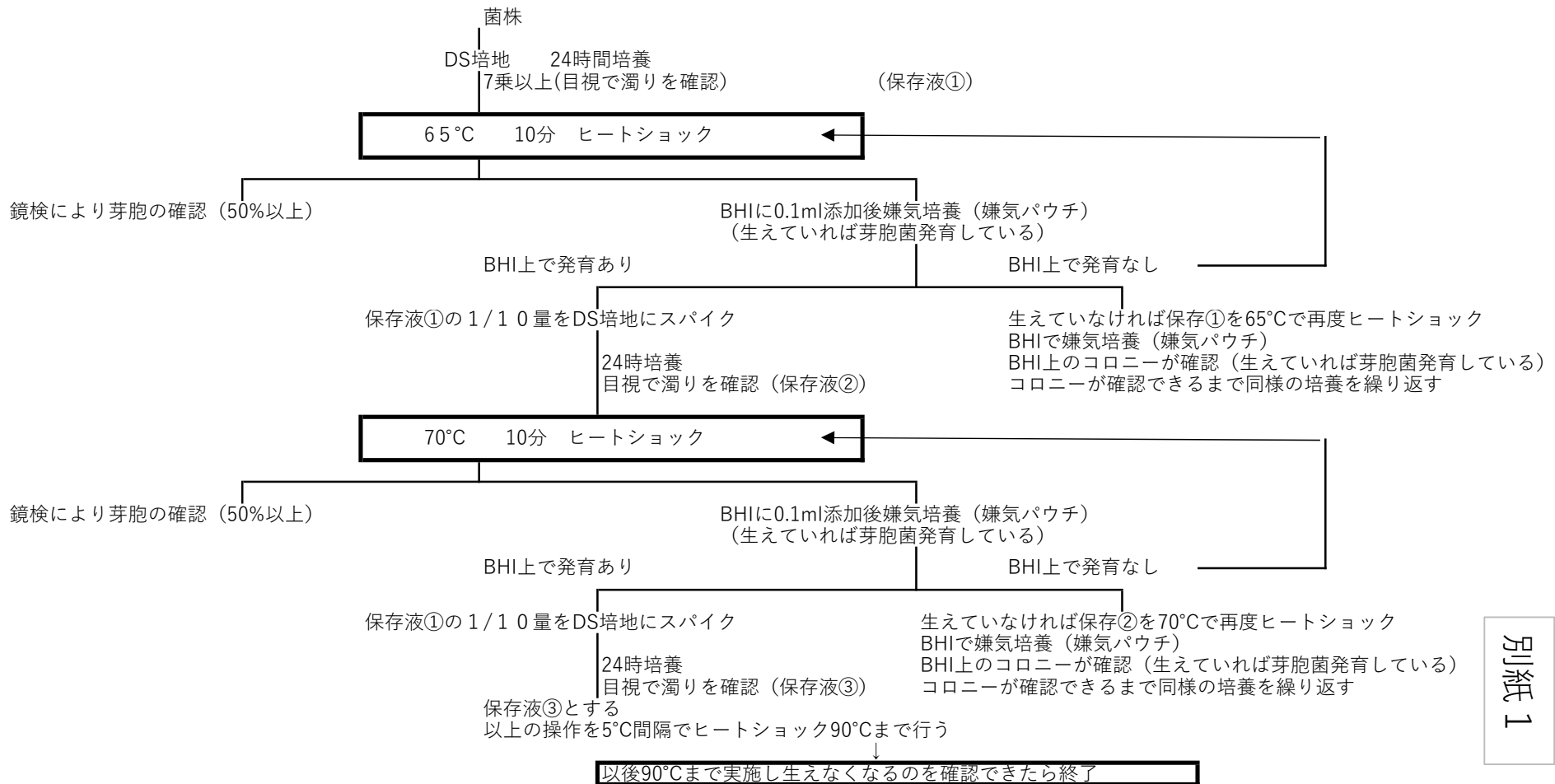
## 耐熱性菌の形成実験

目的： 耐熱性の強い芽胞菌の形成

培地 芽胞形成培地 (DS培地)  
 ブレインハートインフュージョン培地 (BHI)

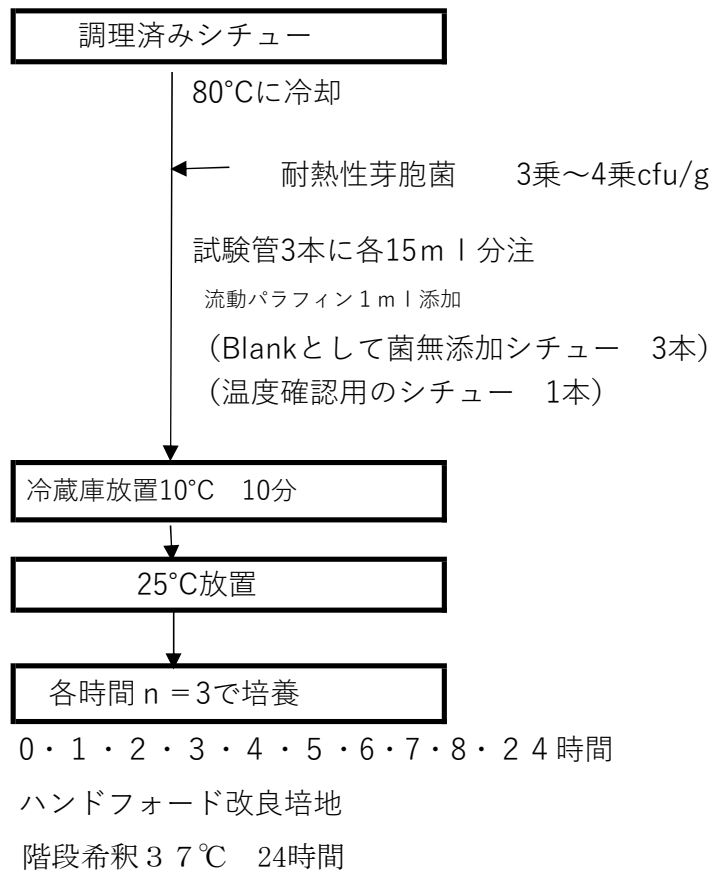
菌株 *Clostridium perfringens* (ウェルシュ菌) H6174 (五十君保存株)

手順： 以下の操作を65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、90°Cの順でヒートショックを行い耐熱菌のクローンを形成する



別紙 1

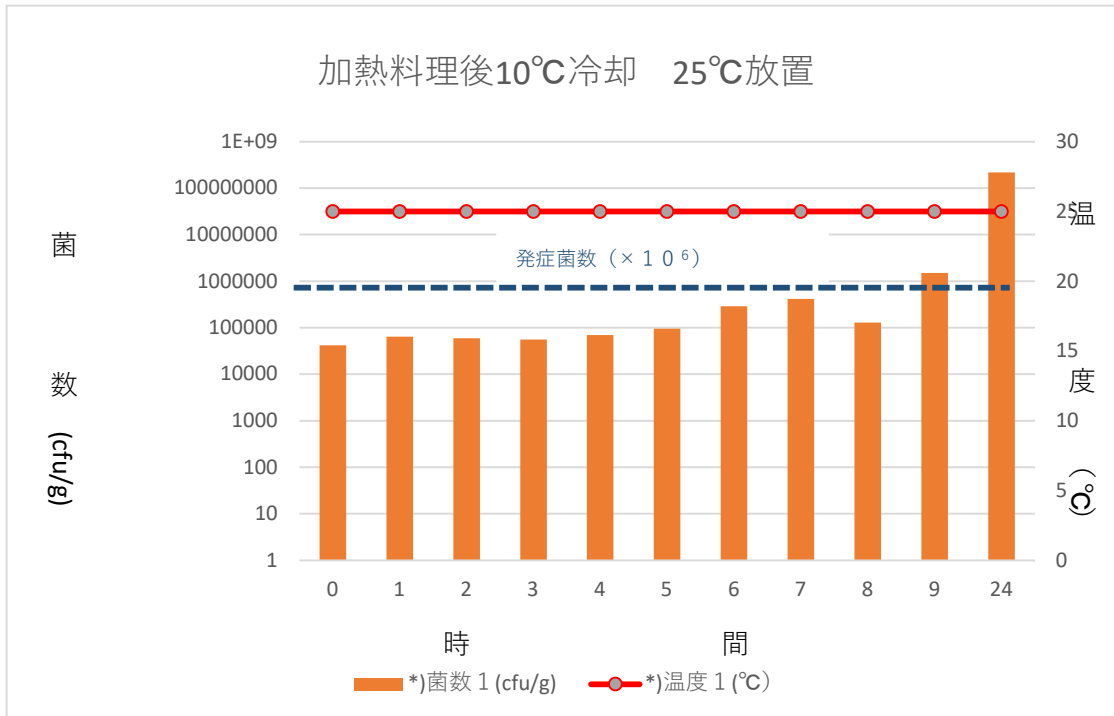
10°C冷却後25°C放置の菌数変化実験 (別紙2)



6







\*) 菌数 1 ・ 温度 2 : 加熱調理後10°C急冷して25°C保存

時間	*)菌数 1 (cfu/g)	*)温度 1 (°C)
0	42000	25
1	65000	25
2	59000	25
3	56000	25
4	70000	25
5	96000	25
6	290000	25
7	420000	25
8	130000	25
9	1500000	25
24	220000000	25

加熱調理後10°C冷却25°C放置

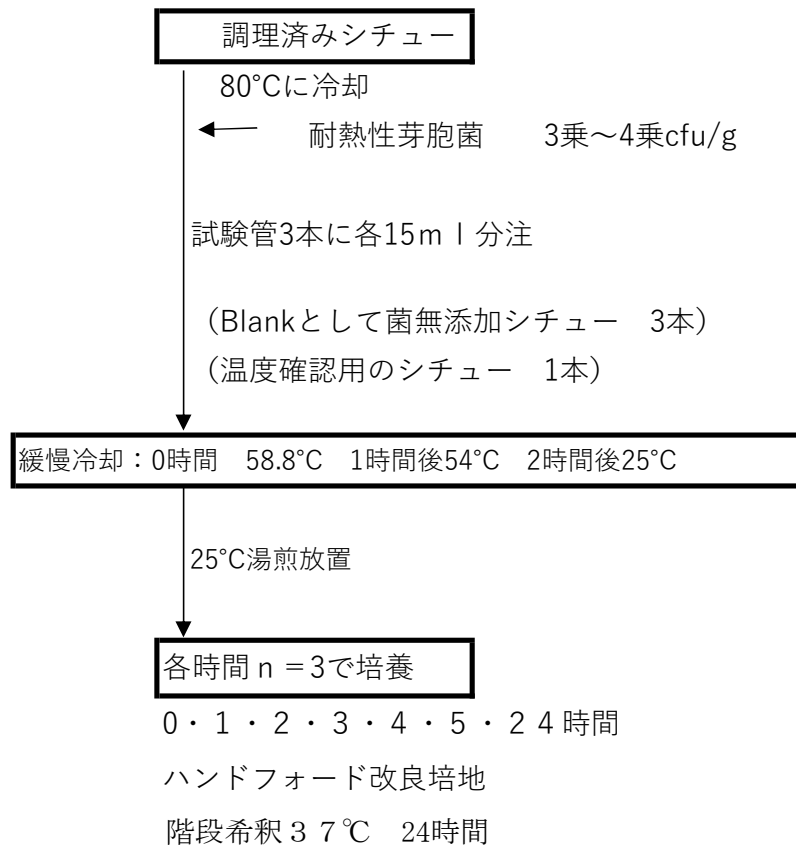
1月22日実験結果

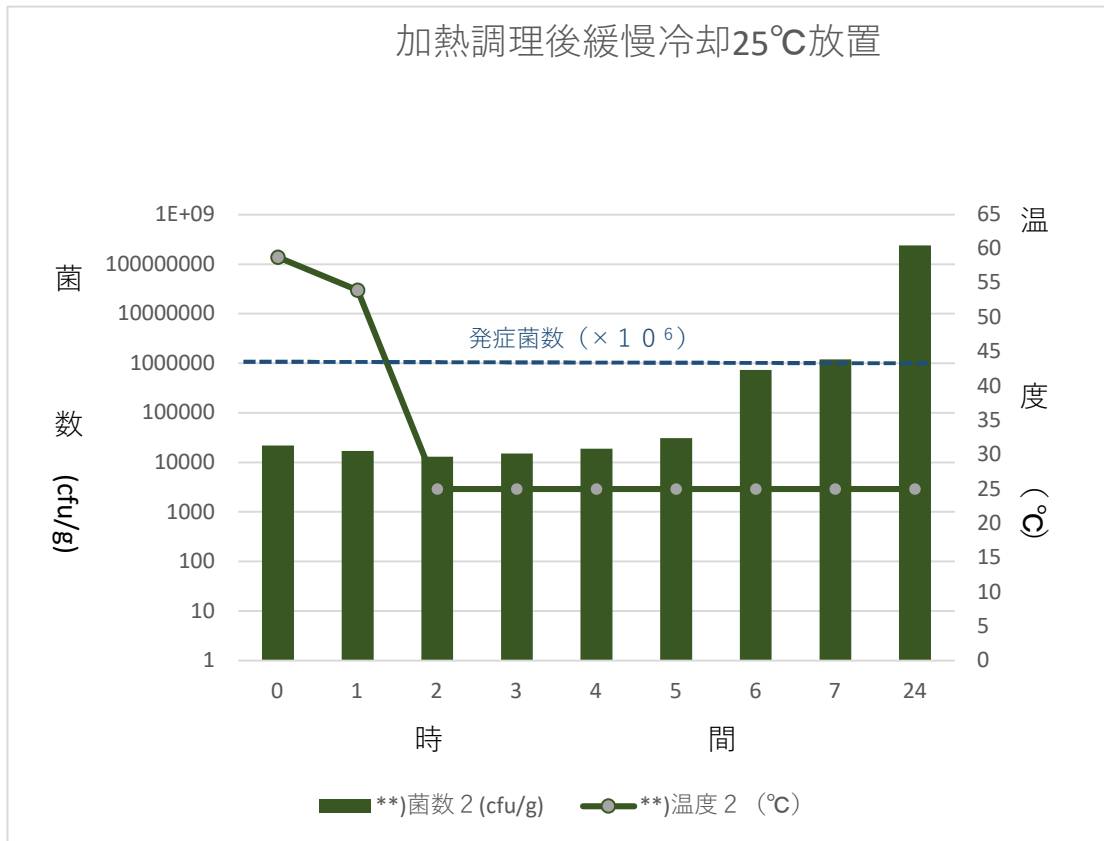
	実験数値				AVE (個/g)
	希釈率	菌数 (個/パウチ)			
未接種	10 <sup>1</sup>	0	0	0	0
0時間	10 <sup>4</sup>	52	37	38	4.2 × 10 <sup>4</sup>
1時間	10 <sup>4</sup>	55	74	66	6.5 × 10 <sup>4</sup>
2時間	10 <sup>4</sup>	56	69	51	5.9 × 10 <sup>4</sup>
3時間	10 <sup>4</sup>	59	58	50	5.6 × 10 <sup>4</sup>
4時間	10 <sup>4</sup>	55	70	85	7.0 × 10 <sup>4</sup>
5時間	10 <sup>4</sup>	84	91	114	9.6 × 10 <sup>4</sup>
6時間	10 <sup>5</sup>	18	26	42	2.9 × 10 <sup>5</sup>
7時間	10 <sup>5</sup>	46	65	16	4.2 × 10 <sup>5</sup>
8時間	10 <sup>5</sup>	13	11	16	1.3 × 10 <sup>5</sup>
9時間	10 <sup>6</sup>	2(10 <sup>5</sup> )	12	17	1.5 × 10 <sup>6</sup>
24時間	10 <sup>8</sup>	19	17	30	2.2 × 10 <sup>8</sup>

2つの平均

シチューを沸騰させ、80°Cに冷却後、ウエルシュ菌を接種  
 接種後すぐに15mL /試験管に分注、流動パラフィンを添加（1mL）を加える。  
 同時に10°Cに冷却、約10分放置後、25°Cで培養を開始した。

緩慢冷却後25°C放置の菌数変化実験





\*\*菌数2・温度2 : 加熱冷却後緩慢冷却して25°C保存

時間	**菌数2 (cfu/g)	**温度2 (°C)
0	22000	58.8
1	17000	54
2	13000	25
3	15000	25
4	19000	25
5	31000	25
6	730000	25
7	1200000	25
24	240000000	25

加熱調理後緩慢冷却25°C放置

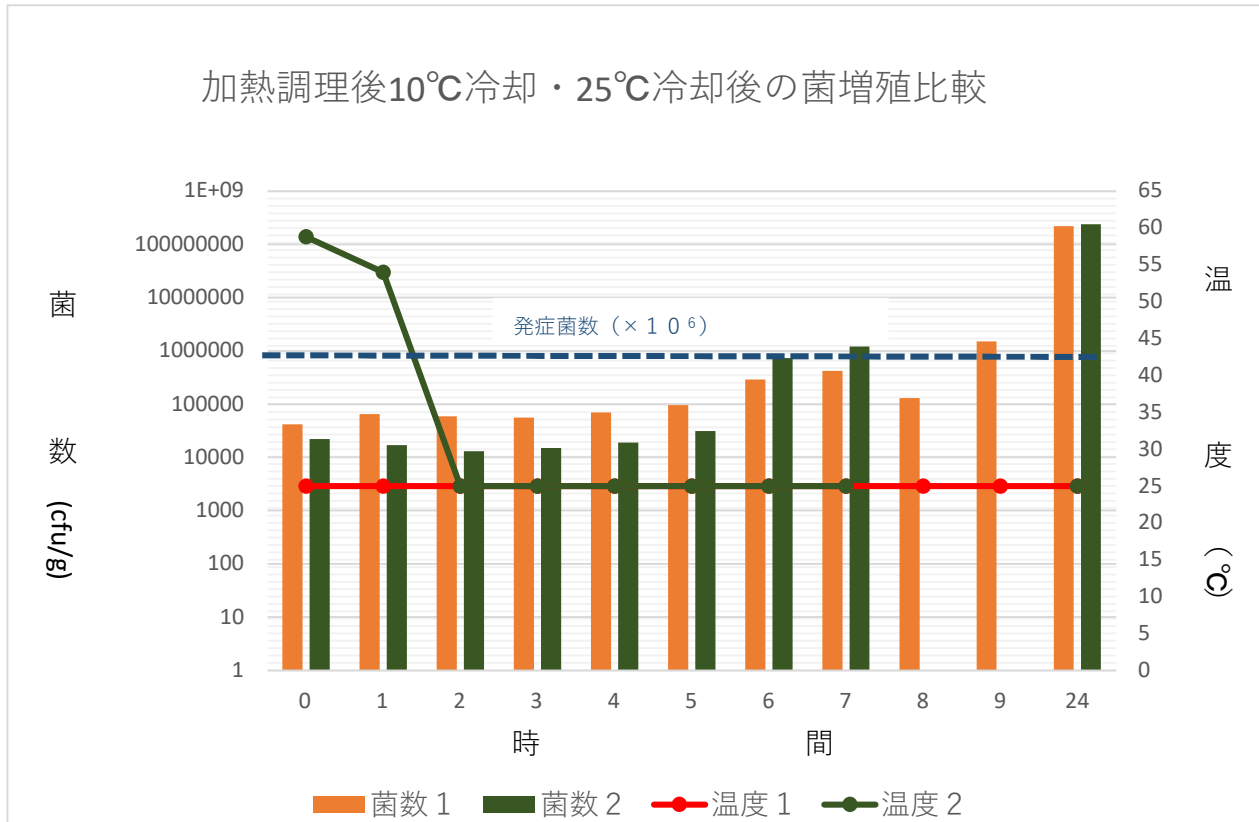
2月6日実験結果

		実験数値				AVE (個/g)	セッティング温度
		希釈率	菌数 (個/パウチ)				
未接種		10 <sup>1</sup>	0	0	0	0	
接種	0時間	10 <sup>4</sup>	28	19	19	2.2 × 10 <sup>4</sup>	58.8°C
	1時間	10 <sup>4</sup>	15	8	27	1.7 × 10 <sup>4</sup>	54°C
	2時間	10 <sup>4</sup>	17	6	16	1.3 × 10 <sup>4</sup>	25°C
	3時間	10 <sup>4</sup>	12	12	22	1.5 × 10 <sup>4</sup>	25°C
	4時間	10 <sup>4</sup>	22	21	13	1.9 × 10 <sup>4</sup>	25°C
	5時間	10 <sup>4</sup>	26	23	44	3.1 × 10 <sup>4</sup>	25°C
	6時間	10 <sup>5</sup>	6	8	8	7.3 × 10 <sup>5</sup>	25°C
	7時間	10 <sup>5</sup>	20	11	4	1.2 × 10 <sup>6</sup>	25°C
	24時間	10 <sup>8</sup>	23	24	24	2.4 × 10 <sup>8</sup>	25°C

温度変化：58.8→51.9→25°C (詳細はデータログ)

伊藤様の温度変化に準じて行った。

別紙 5 - 2



時間	*)菌数 1 (cfu/g)	*)温度 1 (°C)	**)菌数 2 (cfu/g)	**)温度 2 (°C)
0	42000	25	22000	58.8
1	65000	25	17000	54
2	59000	25	13000	25
3	56000	25	15000	25
4	70000	25	19000	25
5	96000	25	31000	25
6	290000	25	730000	25
7	420000	25	1200000	25
8	130000	25	**)NT	**) NT
9	1500000	25	**)NT	**) NT
24	220000000	25	240000000	25

\*) 菌数 1・温度 2 : 加熱調理後10°C急冷して25°C保存

\*\*) 菌数 2・温度 2 : 加熱冷却後緩慢冷却して25°C保存

\*\*)NT : No Test

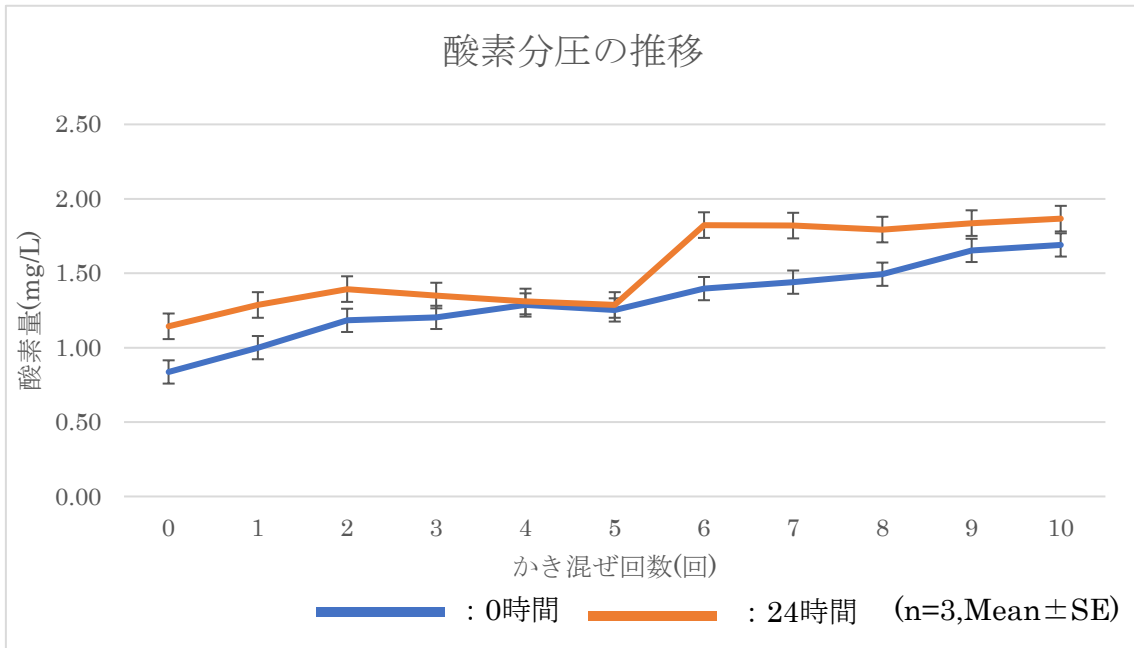


Fig. 1 かき混ぜによる溶存酸素量の推移

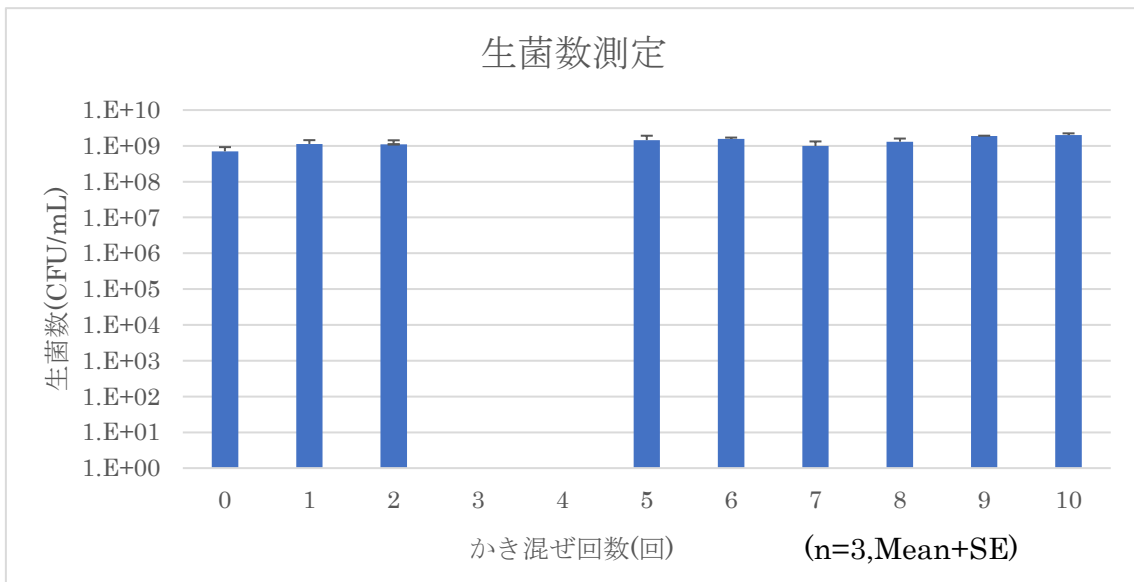


Fig. 2 各酸素分圧の培地における生菌数